

Process, device and reagent for cell separation

Patent number: US2002028431
Publication date: 2002-03-07
Inventor: JULIEN JEAN-CLAUDE BISCONTE DE (FR)
Applicant:
Classification:
- **international:** G01N1/30; C12N5/08
- **european:** C12Q1/24, G01N33/50, G01N33/574, G01N33/576B,
G01N33/576F
Application number: US20010790673 20010222
Priority number(s): FR19980010696 19980825; WO1999FR01976
19990823

Also published as:WO0011210 (A)
EP1108057 (A1)
FR2782730 (A1)**Abstract of US2002028431**

A cell separation process for the isolation of pathogenic cells in a small concentration in a biological fluid specimen, including treating the biological specimen to modify in a differential manner selected rare cells and other cells and causing differential migration of cells that reacted during treatment versus cells that did not react during treatment

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 782 730**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)
(21) N° d'enregistrement national : **98 10696**
(51) Int Cl⁷ : C 12 M 3/06, G 01 N 33/50

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 25.08.98.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 03.03.00 Bulletin 00/09.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : BIOCOP Société anonyme — FR.

(72) Inventeur(s) : BISCONTE DE SAINT JULIEN JEAN CLAUDE.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : BREESE MAJEROWICZ.

(54) PROCÉDE DE SEPARATION CELLULAIRE POUR L'ISOLATION DE CELLULES PATHOGÉNIQUES, NOTAMMENT CANCEREUSES RARES, EQUIPEMENT ET REACTIF POUR LA MISE EN OEUVRE DU PROCÉDE ET APPLICATION DU PROCÉDE.

(57) La présente invention concerne un procédé de séparation cellulaire pour l'isolation de cellules pathogéniques présentes en très faible concentration dans un échantillon de liquide biologique caractérisé en ce que l'on procède à la filtration de l'échantillon de liquide biologique à l'aide d'un filtre présentant une porosité de comprise entre 5 et 10 µm, ainsi qu'un procédé de détection de cellules, les réactifs pour la mise en oeuvre de ces procédés et les applications de ces procédés.



PROCEDE DE SEPARATION CELLULAIRE POUR
L'ISOLATION DE CELLULES PATHOGÉNIQUES, NOTAMMENT
CANCEREUSES RARES, EQUIPEMENT ET REACTIF POUR LA MISE EN
ŒUVRE DU PROCEDE ET APPLICATION DU PROCEDE.

5 La présente invention concerne le domaine de la détection de cellules cancéreuses circulantes dans un liquide biologique, notamment dans le sang ou dans le liquide céphalo-rachidien.

10 L'invention concerne plus particulièrement la détection de cellules pathologiques telles que des micrométastases, pouvant diffuser spontanément après une intervention chirurgicale, en particulier l'ablation d'un organe cancéreux, ou des cellules lymphocytes infectées par des virus.

15 La détection précoce des micrométastases permet d'évaluer les risques de dissémination et d'apparition de cancers secondaires. La difficulté de la détection de telles micrométastases provient de la très faible quantité de cellules présentes dans un échantillon de sang.

20 La détection précoce de lymphocytes infectées par des virus permet de procéder à une détection indirecte et précoce de maladies virales.

25 Pour séparer de tels événements rares, on a proposé dans l'art antérieur de procéder préalablement à un marquage cellulaire. En particulier, on a proposé de fixer spécifiquement les cellules cancéreuses sur des billes magnétiques. On utilise également les trieurs de cellules ou encore la méthode PCR (Polymérase Chain Reaction). Ces méthodes sont longues et peu exploitables en routine.

30 De plus de telles solutions sont relativement difficiles à mettre en œuvre en raison de différents artefacts propres à ces procédés. Une des difficultés provient par exemple de l'agglomération de billes et du masquage des cellules fixées sur des billes, par les billes magnétiques excédentaires. De fait, cette méthode n'est pas

applicable de façon satisfaisante car elle rend difficile l'accès à la morphologie des cellules.

Le but de l'invention est de remédier à ces inconvénients en proposant un procédé facile à mettre en œuvre, présentant une plus grande fiabilité que les méthodes de l'art antérieur et permettant la confirmation du diagnostic par l'accès à la morphologie cellulaire comme les anatomo-pathologistes en ont la pratique.

L'invention vise selon son acceptation la plus générale un procédé de séparation, et en particulier un procédé de détection de cellules rares. Elle consiste à traiter l'échantillon biologique afin de modifier de façon différentielle les cellules rares recherchées d'une part et les autres cellules d'autre part, et à assurer une migration différentielle des cellules ayant réagi avec le réactif, par rapport aux cellules n'ayant pas réagi.

A cet effet, l'invention concerne un procédé de séparation cellulaire pour l'isolation de cellules pathogéniques présentes en très faible concentration dans un échantillon de liquide biologique caractérisé en ce que l'on procède à la filtration de l'échantillon préalablement à l'aide d'un filtre présentant une porosité comprise entre 5 et 10 μm .

Par "liquide biologique", on entendra, au sens du présent brevet, le sang et ses dérivés (plasma, sérum), ainsi que le liquide céphalo-rachidien, le liquide lymphatique et le liquide articulaire.

Par "cellules pathogéniques" on entendra, au sens du présent brevet, des cellules présentant un état anormal révélateur d'une maladie, et en particulier :

- des cellules épithéliales
- des cellules endothéliales
- des micrométastases
- des cellules infectées par un virus.

A titre d'exemple, l'invention permet de détecter des micrométastases dans un échantillon de sang, ou des cellules infectées par le virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C dans un liquide biologique, ou encore des cellules infectées dans un échantillon de liquide céphalo-rachidien.

De préférence, on procède à la filtration de l'échantillon avec un filtre présentant des pores d'environ 8 µm.

Selon un mode de mise en œuvre préféré, on procède avant l'étape de filtration à une étape de préparation de l'échantillon consistant à additionner à l'échantillon de sang un réactif de lyse des globules rouges et de durcissement différentiel des cellules étrangères au sang. La fonction de ce réactif est de protéger les cellules nucléées du sang, en préservant leur déformabilité, et de rigidifier les cellules étrangères, notamment les cellules riches en cytokératine.

Les cellules du sang peuvent ainsi, du fait de leur souplesse, traverser le filtre nonobstant une section nominale supérieure à la porosité du filtre, par déformation de la membrane. Les autres cellules sont arrêtées par le filtre, même si leurs dimensions sont comparables aux cellules cibles, en raison de la rigidification de la membrane.

Selon une variante préférée, on additionne à l'échantillon de sang un réactif composé d'EDTA, de sérum albumine bovine, de Saponine, de formaldéhyde et de PBS.

Avantageusement, le procédé comporte une étape de préparation de l'échantillon consistant à additionner à une unité d'échantillon de sang à neuf unités de réactif de lyse des globules rouges et de fixation des cellules nucléées et en ce que l'on laisse incuber ladite préparation pendant 15 minutes environ.

Selon un mode de réalisation préféré, la filtration s'effectue sous une dépression d'environ 50000 Pa.

5 Selon une autre variante avantageuse, on procède à l'agitation de l'échantillon au-dessus du filtre.

10 L'invention concerne en particulier un procédé de détection de la présence de cellules susceptibles d'être présentes entre très faible concentration dans un échantillon de liquide biologique caractérisé en ce qu'il 15 comporte les étapes consistant à :

-) - faire réagir un réactif spécifique aux particules à déetecter, ou, au contraire, aux particules normalement présentes dans l'échantillon biologique et susceptible de masquer la présence de cellules recherchées de manière à modifier les propriétés physiques des cellules ayant réagi ;
15 - effectuer un enrichissement d'une partie de l'échantillon par un processus de sélection physique assurant la migration différentielle des particules ayant réagi avec le réactif par rapport aux particules n'ayant pas réagi ;
20 - procéder à la révélation de la présence éventuelle des particules recherchées dans la partie de l'échantillon enrichie en particules recherchées.

25 Selon un mode de mise en œuvre particulier, on fait réagir un réactif modifiant la déformabilité relative des cellules recherchées par rapport à la déformabilité des cellules susceptibles de masquer les cellules recherchées.

30 L'invention concerne également un réactif pour la séparation cellulaire caractérisé en ce qu'il comporte un détergent propre à dégrader la membrane lipidique des globules rouges, et un fixateur propre à durcir la membrane des cellules nucléées.

35 Avantageusement, le réactif comporte une partie au moins des produits suivants : l'EDTA, du BSA, de la

Saponine, du Formaldéhyde et du PBS, ou des équivalents de ces produits.

5 Selon un mode de mise en œuvre particulier, le réactif selon l'invention est constitué par 372 mg d'EDTA, 1 g de BSA, 1,75 g de Saponine, 10 ml de Formaldéhyde dosé à 37% et une quantité suffisante de PBS pour réaliser 1 l de réactif.

10 L'invention concerne encore un équipement pour la détection de cellules cancéreuses dans un échantillon de sang caractérisé en ce qu'il comporte une membrane de filtration présentant une porosité comprise entre 5 et 10 µm, et de préférence une porosité d'environ 8 µm.

15 Selon une variante préférée, l'équipement selon l'invention comporte des moyens pour créer un flux sensiblement tangentiel à la surface du filtre.

De préférence, il comporte en outre des moyens pour créer une dépression d'environ 50000 Pa sous le filtre.

20 Par ailleurs, l'équipement pour la numération de cellules isolées comporte un filtre présentant une porosité d'environ 8 microns et un moyen d'analyse d'image du filtrat.

25 L'équipement permet la sélection et le recueil individuel des cellules à des fins de caractérisation ultérieure (par exemple au moyen de la PCR) et il comporte un filtre de porosité adapté à la taille des cellules cibles.

30 L'invention concerne encore l'application du procédé de séparation pour la détection de micrométastases dans un échantillon sanguin, pour la détection de cellules infectées par un virus dans un liquide biologique, pour la détection de cellules infectées par un virus dans un échantillon de liquide céphalorachidien ou pour la

diagnostic et le suivi de rechutes de maladies cancéreuses ou virales.

L'invention permet la détection rapide d'infections chez des patients immunodéprimés par séparation cellulaire à partir d'un échantillon de liquide céphalo-rachidien; ainsi que la prévention, la détection et le suivi dans des maladies cancéreuses ou virologiques.

L'invention sera décrite dans ce qui suit à titre d'exemple non limitatif.

On prélève un échantillon de 5 ml de sang global, peu de temps après la prise de sang.

On additionne à cet échantillon 45 ml de réactif et on laisse reposer pendant 15 minutes.

Selon une variante de mise en œuvre, le réactif est composé comme suit :

- 372 mg d'EDTA, commercialisé par la société SIGMA sous la référence E5134
- 1 g de BSA Fraction V (Sérum albumine bovine) commercialisé par la société SIGMA sous la référence E4503
- 1,75 g de Saponine commercialisé par la société FLUKA sous la référence 84510
- 10 ml de Formaldéhyde à 37% commercialisé par la société MERCK sous la référence 4003
- QSP de PBS.

Le pH est ajusté à 7,2.

Le PBS est préparé comme suit :

- 8 g de chlorure de sodium
- 0,2 g de chlorure de potassium
- 2,3 g de di-sodium hydrogenophosphate
- 0,2 g de Potassium dihydrogenophosphate.

Après une incubation pendant environ 15 minutes à température ambiante, on procède à la filtration de cette préparation sur une feuille de polycarbonate présentant des

trous d'environ 8 μm de section. Le filtre est soumis à une dépression de l'ordre de 50000 Pa.

5 La filtration s'effectue à l'aide d'un équipement présentant un récipient dans lequel est déposée la préparation de sang et de réactif. Le fond de ce récipient est formé par un filtre. Selon une variante, un rotor est disposé à l'intérieur du récipient. Il forme un flux tangentiel à la surface du filtre, de façon à provoquer le détachement des cellules et éviter le 10 colmatage du filtre en cours de filtration.

) On procède ensuite au rinçage à l'aide de 5 ml d'une solution de chlorure de sodium à 0,9%, à un pH de 7.

15 L'impact est coloré avec 1 ml d'acridine à 0,025% à pH 6,6 (tampon citrate) ou par 1 ml d'iodure de propidium 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (tampon NaCl) durant 10 mn. Pendant la coloration, le filtre formant le fond du récipient est obturé pour éviter la perfusion du liquide. Le filtre est ensuite rincé par 1 ml de tampon citrate Ph 3.

20 Les cellules ainsi isolées peuvent ensuite faire l'objet d'un comptage par un système d'imagerie, par microscopie ou par un système de comptage de photons à large champ.

Elles peuvent également être récupérées pour une amplification par PCR de l'ADN des cellules isolées.

25 Les cellules isolées peuvent être marquées ou faire l'objet d'une hybridation sélective par un réactif spécifique type PNA (peptide Nucléic Acids) ou par des anticorps monoclonaux.

30 L'invention est décrite dans ce qui précède à titre d'exemple non limitatif.

R E V E N D I C A T I O N S

1 Procédé de séparation cellulaire pour l'isolation de cellules pathogéniques présentes en très faible concentration dans un échantillon de liquide biologique caractérisé en ce qu'il comporte une étape de traitement de l'échantillon biologique afin de modifier de façon différentielle les cellules rares recherchées d'une part et les autres cellules d'autre part, et une étape de migration différentielle des cellules ayant réagi avec le réactif, par rapport aux cellules n'ayant pas réagi.

2 Procédé de séparation cellulaire pour l'isolation de cellules pathogéniques présentes en très faible concentration dans un échantillon de liquide biologique selon la revendication 1 caractérisé en ce que l'on procède à la filtration de l'échantillon de liquide biologique à l'aide d'un filtre présentant une porosité comprise entre 5 et 10 μm .

3 - Procédé de séparation cellulaire selon la revendication 2 caractérisé en ce que l'on procède à la filtration de l'échantillon avec un filtre présentant des trous d'environ 8 μm .

4 - Procédé de séparation cellulaire selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'on procède avant l'étape de filtration à une étape de préparation de l'échantillon consistant à additionner à l'échantillon de sang un réactif de lyse des globules rouges et de fixation des cellules nucléées.

5 - Procédé de séparation cellulaire selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'on procède avant l'étape de filtration à une étape de préparation de l'échantillon consistant à additionner à l'échantillon de sang un réactif composé d'EDTA, de sérum albumine bovine, de Saponine, de formalhéhyde et de PBS.

6 -Procédé de séparation cellulaire selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'on procède avant l'étape de filtration à une étape de préparation de l'échantillon consistant à additionner à une unité d'échantillon de sang à neuf unités de réactif de lyse des globules rouges et de fixation des cellules nucléées et en ce que l'on laisse incuber ladite préparation pendant 15 minutes environ.

7 -Procédé de séparation cellulaire selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la filtration s'effectue sous une dépression d'environ 50000 Pa.

8 -Procédé de détection de la présence de cellules susceptibles d'être présentes entre très faible concentration dans un échantillon de liquide biologique selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comporte les étapes consistant à :

- faire réagir un réactif spécifique aux particules à détecter, ou, au contraire, aux particules normalement présentes dans l'échantillon biologique et susceptible de masquer la présence de cellules recherchées de manière à modifier les propriétés physiques des cellules ayant réagi ;
- effectuer un enrichissement d'une partie de l'échantillon par un processus de sélection physique assurant la migration différentielle des particules ayant réagi avec le réactif par rapport aux particules n'ayant pas réagi ;
- procéder à la révélation de la présence éventuelle des particules recherchées dans la partie de l'échantillon enrichie en particules recherchées.

9 -Procédé de détection de la présence de cellules susceptibles d'être présentes entre très faible concentration dans un échantillon de liquide biologique selon la revendication 8 caractérisé en ce que l'on fasse réagir un réactif modifiant la déformabilité relative des

6 -Procédé de séparation cellulaire selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'on procède avant l'étape de filtration à une étape de préparation de l'échantillon consistant à additionner à une unité d'échantillon de sang à neuf unités de réactif de lyse des globules rouges et de fixation des cellules nucléés et en ce que l'on laisse incuber ladite préparation pendant 15 minutes environ.

7 -Procédé de séparation cellulaire selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que la filtration s'effectue sous une dépression d'environ 50000 Pa.

8 -Procédé de détection de la présence de cellules susceptibles d'être présentes entre très faible concentration dans un échantillon de liquide biologique selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comporte les étapes consistant à :

- faire réagir un réactif spécifique aux particules à détecter, ou, au contraire, aux particules normalement présentes dans l'échantillon biologique et susceptible de masquer la présence de cellules recherchées de manière à modifier les propriétés physiques des cellules ayant réagi ;

- effectuer un enrichissement d'une partie de l'échantillon par un processus de sélection physique assurant la migration différentielle des particules ayant réagi avec le réactif par rapport aux particules n'ayant pas réagi ;

- procéder à la révélation de la présence éventuelle des particules recherchées dans la partie de l'échantillon enrichie en particules recherchées.

9 -Procédé de détection de la présence de cellules susceptibles d'être présentes entre très faible concentration dans un échantillon de liquide biologique selon la revendication 8 caractérisé en ce que l'on fasse réagir un réactif modifiant la déformabilité relative des

réagir un réactif modifiant la déformabilité relative des cellules recherchées par rapport à la déformabilité des cellules susceptibles de masquer les cellules recherchées.

5 10 Réactif pour la séparation cellulaire selon le procédé conforme à l'une au moins des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il comporte un détergent propre à dégrader la membrane lipidique des globules rouges, et un fixateur propre à durcir la membrane des cellules nucléées.

10 11 Réactif selon la revendication 10 caractérisé en ce qu'il comporte une partie au moins des produits suivants : l'EDTA, du BSA, de la Saponine, du Formaldéhyde et du PBS, ou des équivalents de ces produits.

15 12 Réactif selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il est constitué par 372 mg d'EDTA, 1 g de BSA, 1,75 g de Saponine, 10 ml de Formaldéhyde dosé à 37% et une quantité suffisante de PBS pour réaliser 1 l de réactif.

20 13 - Equipement pour la séparation de cellules pathogéniques dans un échantillon de sang caractérisé en ce qu'il comporte une membrane de filtration présentant une porosité comprise entre 5 et 10 microns.

25 14 - Equipement pour la détection de cellules pathogéniques dans un échantillon de liquide biologique selon la revendication 13 caractérisé en ce que le filtre présente une porosité d'environ 8 microns.

30 15 - Equipement pour la détection de cellules pathogéniques dans un échantillon de biologique selon la revendication 13 ou 14 caractérisé en ce qu'il comporte des moyens pour créer un flux sensiblement tangentiel à la surface du filtre.

16 - Application du procédé de séparation selon l'une au moins des revendications 1 à 9 pour la détection de micrométastases dans un échantillon sanguin.

17 - Application du procédé de séparation selon l'une au moins des revendications 1 à 9 pour la détection de cellules infectées par un virus dans un liquide biologique.

5 18 - Equipement pour la numération de cellules cibles isolées par le procédé selon l'une au moins des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il comporte un filtre présentant une porosité d'environ 8 microns et un moyen de comptage de photons à large champs.

10 19 - Equipement pour la numération de cellules isolées par le procédé selon l'une au moins des revendications 1 à 9 caractérisé en ce qu'il comporte un filtre présentant une porosité d'environ 8 microns et un moyen d'analyse d'image du filtrat.

15 20 - Equipement permettant la sélection et le recueil individuel des cellules à des fins de caractérisation ultérieure (par exemple au moyen de la PCR) et selon le procédé comportant l'une au moins des revendications 1 à 9 caractérisé en ce qu'il comporte un filtre de porosité adapté à la taille des cellules cibles.

{}

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 565613
FR 9810696

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée	DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
X	C.H. ZIERDT ET AL.: "Development of a Lysis-Filtration Blood Culture Technique" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 5, no. 1, 1977, pages 46-50, XP002101630 "Material and Methods" * abrégé *	1-4				
X	WO 91 04318 A (TRANCEL CORP) 4 avril 1991 * revendication 1 *	1				
X	US 4 751 179 A (LEDIS STEPHEN L ET AL) 14 juin 1988 * abrégé * * colonne 1, ligne 61 - ligne 64 *	10				
A	EP 0 277 837 A (UNIV BROWN RES FOUND) 10 août 1988 * abrégé *	1-20				
A	DE 28 08 039 A (SANKI ENG CO LTD) 31 août 1978 * abrégé *	1-20	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)	C12Q G01N		
A	US 5 532 139 A (MILLER FREDERICK N) 2 juillet 1996 * le document en entier *	1-20				
1						
		Date d'achèvement de la recherche	Examinateur			
		29 avril 1999	Hoekstra, S			
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES						
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire						
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant						